

**Untersuchungen zur Frage der
Ausscheidung von Hippursäure und Benzoesäure
im menschlichen Harn**

von
Harald Ziener
aus
Nürnberg

1972 W 263

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von Hippursäure und Benzoessäure im menschlichen Harn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



vorgelegt
von
Harald Ziener
aus
Nürnberg

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Koch

Referent: Prof. Dr. Dr. Geldmacher-von Mallinckrodt

Correferent: Prof. Dr. Dr. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 2. 1972

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. <u>Einleitung:</u> <u>Der Stoffwechsel von Giften ins-</u> <u>besondere der Benzoesäure</u>	1
B. <u>Untersuchungen über die Ausscheidung</u> <u>von Hippursäure und Benzoesäure im</u> <u>menschlichen Harn</u>	
I. <u>Untersuchungen an chronisch</u> <u>Schizophrenen</u>	4
II. <u>Untersuchungen von G.SCHMIDT</u> ...	5
III. <u>Untersuchungen von WALZ</u>	5
IV. <u>Untersuchungen von DEISEL</u>	6
V. <u>Untersuchungen von BURGDORF</u>	6
VI. <u>Die Hippuricase</u>	7
C. <u>Problemstellung</u>	8
D. <u>Eigene Untersuchungen</u>	9
I. <u>Das Extraktionsverfahren</u>	9
II. <u>Vorversuche mit der</u> <u>Vakuumsublimation</u>	10
III. <u>Vorversuche mit der</u> <u>Papierchromatographie</u>	11

IV.	<u>Dünnschichtchromatographische</u>	
	<u>Untersuchungen</u>	
1.	<u>Suche nach einem geeigneten</u>	
	<u>Laufmittel</u>	12
2.	<u>Wiederfindungsversuche</u> ...	13
3.	<u>Prüfung auf freie Benzoesäure</u>	
	<u>im Harn von 30 Personen</u> ...	13
E.	<u>Diskussion und Zusammen-</u>	
	<u>fassung</u>	14
	<u>Literatur</u>	17

A. EINLEITUNG
DER STOFFWECHSEL VON GIFTEN,
INSBESONDERE DER BENZOESÄURE

Vom Körper aufgenommene oder im Stoffwechselgeschehen des menschlichen Organismus gebildete für den Gesamtorganismus schädliche oder nicht mehr verwertbare Substanzen können gebunden und dann als gepaarte Verbindungen ausgeschieden werden.

Diese Entgiftung und Überführung in wasserlösliche Form findet in der Leber statt, von wo aus diese Substanzen über die Gallenflüssigkeit bzw. die Niere zur Ausscheidung kommen.

Zu diesen Produkten gehört auch die Benzoessäure.

Ihre Herkunft erklärt sich zum größten Teil aus den aromatischen und hydroaromatischen Teilen der Pflanzennahrung, zu denen unter anderem Salicylhydrazid, Benzhydrazid, Benzohydroxamsäure, L-Chinasäure, Cyclohexylpropionsäure, phenylsubstituierte Fettsäuren, Zimtsäure, Vanillinsäure u.v.a. zählen.

Nach BUDDECKE (1970) besteht das Prinzip dieser Entgiftungsreaktionen darin, solche Substanzen durch Konjugation mit einem physiologischen Stoffwechselprodukt bezüglich ihrer Toxizität, Bindungsfähigkeit an Proteine bzw. Lipide und ihrer Löslichkeit so zu verändern, daß sie stoffwechselindifferente Ausscheidungsprodukte werden.

Eine andere Möglichkeit ist die vorherige chemische Veränderung z. B. durch Oxydation oder Reduktion, an die sich gegebenenfalls eine Konjugationsreaktion anschließt.

Zur Entgiftung der Benzoessäure finden wir nach STRAUB (1963) eine reine Konjugationsreaktion, die beim Menschen hauptsächlich in der Leber, aber auch in der Niere und anderen Organen stattfindet und vorwiegend als Glycinkonjugation

abläuft. Zuerst erscheint ein Derivat der Benzoesäure mit dem Koenzym A. Dieses Benzoyl-Koenzym A verbindet sich dann mit Glycocoll, das im Körper aus den Aminosäuren Cystein, Threonin und Serin entstehen kann.

Der tiefere Sinn der Detoxikationsreaktionen, speziell auch dieser Glycinkonjugation, wird in sehr einleuchtender Weise, jedoch auf teilweise hypothetischer Basis bei FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ (1966) dargestellt:

So setzen nach BERCZELLER (1917) diejenigen Verbindungen, die der Paarung unterliegen, die Oberflächenspannung der Flüssigkeiten, in denen sie gelöst sind, herab, während Paarungsprodukte in dieser Hinsicht ganz oder nahezu inaktiv sind. Damit wird die Tendenz von Stoffen, sich an Oberflächen anzureichern und dort toxische Wirkungen zu entfalten, vermindert, wobei als Beispiel unter anderem die Umwandlung der Benzoesäure in Hippursäure sowie des Menthols in Mentholglukuronsäure dient.

Nach SCHÜLLER (1925) beruht die Entgiftung durch Paarung auf Änderung der Lipoidlöslichkeit:

Glycocoll, Schwefelsäure und Glucuronsäure sind sehr gut in Wasser löslich, jedoch wenig löslich in Äther und anderen Lipoidlösungsmitteln, insbesondere in Fetten und Lecithin.

Im Gegensatz dazu sind die meisten Stoffe, die an Glycocoll, Schwefelsäure oder Glucuronsäure gekettet werden, sehr gut lipoidlöslich z.B. Phenol, Benzoesäure, Campher, Chloralhydrat. In Form ihrer Paarungsprodukte sind diese Verbindungen jedoch in den Lipoiden nur wenig löslich oder überhaupt unlöslich. Aus diesem Grunde vermögen die Paarungsprodukte in bestimmte Zellgebiete nicht mehr einzudringen und deshalb auch keine Giftwirkungen mehr zu entfalten. Sie gelangen zwar beim Ausscheiden noch von Zelle zu

Zelle, jedoch nicht mehr an solche Oberflächen, die für den Stoffwechsel von Bedeutung sind.

Nach HOEBER (1947) bietet die Steigerung der Polarität durch Konjugation verschiedene Vorteile für die Ausscheidung einer Substanz:

Toxische Substanzen, die entweder als Stoffwechselprodukte entstehen oder irgendwie in den Körper eintreten und oft schwache Elektrolyte und löslich in Lipoiden sind, dringen aus diesen Gründen leicht in die Zellen ein.

Ein gebräuchliches Vorgehen des lebenden Organismus zur Entgiftung dieser Substanzen ist ihre Kupplung mit relativ starken Säuren wie Schwefelsäure, Glukuronsäure und anderen.

Dieser Einbau des Giftes in einen starken Elektrolyten führt im allgemeinen zu einer Verbindung, die nicht mehr fähig ist, in die Zelle einzudringen. Die Verbindungen werden harnfähig.

Unter Anführung der Hippursäure als Beispiel erörtert HOEBER (1947) die Möglichkeit, daß der starke Elektrolytcharakter einer Substanz bestimmend sein kann für deren Ausscheidung durch aktive Sekretion in den Tubuli der Niere.

Das Hauptentgiftungsprodukt der Benzoesäure ist auch beim Menschen die durch Paarung mit Glycin über den Harn ausgeschiedene Hippursäure, die zum ersten Mal 1829 von LIEBIG aus Pferdeharn dargestellt wurde.

(FLASCHENTRÄGER, LEHNARTZ 1966)

Die normale Ausscheidungsmenge der Hippursäure beim Menschen beträgt etwa 0,7 - 2,5 g pro Tag. (FLASCHENTRÄGER, LEHNARTZ 1966)

B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSSCHIEDUNG VON
HIPPURSÄURE UND BENZOESÄURE IM MENSCHLICHEN HARN

I. UNTERSUCHUNGEN AN CHRONISCH SCHIZOPHRENEN

Nun wurde in letzter Zeit von PERRY und Mitarbeitern (1970) am Department of Pharmacology der Universität von Britisch Columbia in Vacouver, Kanada, eine dem vorher Erwähnten konträre Beobachtung an chronisch Schizophrenen gemacht:

Bei der gaschromatographischen Untersuchung auf flüchtige Fettsäuren im Urin von 52 Patienten mit chronischer Schizophrenie zeigten 10 Kranke bemerkenswert erhöhte Anteile an Essigsäure bei einer oder mehreren Untersuchungen, wobei bei dieser Gruppe keine freie Benzoessäure entdeckt wurde. Weiter jedoch zeigten 3 Patienten eine sehr hohe Ausscheidung freier Benzoessäure und dazu entsprechend reduzierte Anteile an Hippursäure im Urin.

Ähnliche Beobachtungen wurden Jahre vorher von QUASTEL und WALES (1938 und 1940) gemacht:

Eine Gruppe von Schizophrenen schied nach oralen oder intravenösen Gaben von Natriumbenzoat bemerkenswert weniger Hippursäure aus als dies Kontrollpersonen taten, dagegen wurde im Harn freie Benzoessäure gefunden. QUASTEL und WALES (1940) vermuten bei diesen Benzoessäureausscheidern einen Defekt in der Konjugation der Benzoessäure.

Bemerkenswert an der Arbeit von PERRY und Mitarbeitern (1970) ist, daß hervorgehoben wird, daß bei den gesunden Versuchspersonen keine freie Benzoessäure im Urin gefunden werden konnte.

II. UNTERSUCHUNGEN VON G. SCHMIDT

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von PERRY und Mitarbeitern (1970) bei gesunden Personen steht die Feststellung von SCHMIDT (1956) im Zusammenhang mit Vorkommen und Ausscheidung von α -Äthyl- α -Oxybuttersäure nach Adalinalaufnahme im menschlichen Urin:

Nach seinen Untersuchungen ist nach Einnahme von Adalin deutlich vermehrt Benzoessäure im Harn zu finden. Bei erneuter Aufnahme von Adalin nach längerer Pause von mehreren Wochen war immer wieder ein vermehrtes Vorkommen der Benzoessäure im Harn des folgenden Tages festzustellen.

Weiter gibt SCHMIDT (1956) an, daß sich schon normalerweise stark wechselnde Mengen an Benzoessäure im menschlichen Harn finden.

Daneben weist SCHMIDT (1956) darauf hin, daß auch Hippursäure nach Aufnahme verschiedener Arzneimittel vermehrt im Harn gefunden wurde und bei den Versuchen in stark wechselnden Mengen vorkam.

Diese Ergebnisse wurden unter Mitwirkung von WALZ, DEISEL und BURGDORF erhalten.

III. UNTERSUCHUNGEN VON WALZ

WALZ (1954) stellte Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung und des Nachweises von Adalin im Harn an. Dabei fand er mit Hilfe der Vakuumsublimation bei Adalinmedikation nach Extraktion im sauren Milieu im Extraktückstand zweierlei charakteristische Kristallarten. Diese Kristalle konnte er jedoch nicht identifizieren. Die Identifizierung gelang später DEISEL (1955). WALZ (1954) ermittelte bei beiden Kristallarten unter dem Mikroskop den Mikroschmelzpunkt:

Er stellte fest, daß die eine Kristallfraktion ihren Schmelzpunkt bei $204 - 206^{\circ} \text{C}$ hatte, welche DEISEL (1955) als Hippursäure identifizieren konnte; die andere Fraktion, die zwischen $116 - 118^{\circ} \text{C}$ sublimierte, identifizierte wiederum DEISEL (1955) als Benzoesäure.

IV. UNTERSUCHUNGEN VON DEISEL

DEISEL (1955), der in seiner Dissertationsschrift mit dem Titel "Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von Bromdiaethylcarbamid im Harn" die von WALZ ungeklärten Fragen teilweise aufgriff und fortführte, konnte keine nachweisbaren Mengen an Benzoesäure im Harn finden. Er glaubt, daß die bei der Vakuumsublimation gefundene Benzoesäure ein Artefakt durch Zersetzung bei Erhitzen über 200°C der über den Harn ausgeschiedenen Hippursäure sei. Diese Feststellung sah er durch Vakuumsublimation reiner Hippursäure, aus der sich ebenfalls beim Erhitzen über 200°C Benzoesäure niederschlug, bestätigt. DEISEL (1955) fand in der Literatur bei LIMPRICHT und VON USLAR (1853) eine Bestätigung für seine Annahme, denn auch diese Autoren stellten fest, daß sich Hippursäure bei Erhitzen über 200°C in Benzoesäure und Glycocolle teilweise zersetzt.

V. UNTERSUCHUNGEN VON BURGDORF

BURGDORF (1958) untersuchte die Wirkung der Fäulnis auf Harn von Personen, die unter Diäthoxalsäure- und Adalinmedikation standen.

Bei seinen Untersuchungen ergab die Vakuumsublimation der aus den frischen Harnen gewonnenen Extrakte eine starke Kristallausscheidung.

Die Kristalle ließen sich durch Schmelzpunkt, Kristallform und Kristalloptik als Benzoesäure identifizieren.

Bei den Restharnen, die inzwischen 20 - 30 Tage gestanden und gefault waren, konnte durch die Vakuumsublimation neben Diäthoxalsäure Benzoesäure nachgewiesen werden.

VI. DIE HIPPURICASE

Die Auffindung von Benzoesäure in den Versuchen von SCHMIDT (1956) im Harn gesunder Individuen, welche von PERRY und Mitarbeitern (1971) nicht bestätigt wird, kann neben einer Zersetzung von Hippursäure bei hoher Temperatur ihre Ursache in der Wirkung der Hippuricase haben:

Die Hippuricase, die in der Internationalen Nomenklatur unter dem Namen Aminoacylase mit der Enzymnummer E. C. 3.5.1.14 (BARMANN 1969) geführt wird, hat ein vielseitiges Vorkommen:

Bei Menschen findet man die Aminoacylase hauptsächlich in der Niere, daneben in der Leber, dem Pankreas, in Muskeln (Enzyme Nomenclature 1965). Sie kommt aber auch in Bakterien, wie dem *Lactobacillus arabinosus* und in Schimmelpilzen vor (PARK und FOX 1960).

Über den Aufbau der Hippuricase vermutet man (FLASCHENTRÄGER 1966), daß sie, die eine Zwischenstellung zwischen den Amidasen im engeren Sinne und den Peptidasen einnimmt, ein Sulphydril- bzw. Disulfidgruppe enthaltendes Redoxsystem darstellt. Es ist angegeben worden, daß unter dem Einfluß von Oxydationsmitteln die katalytische Reaktion nach der Seite der Synthese umgestellt würde, wobei die Energie für die Hippursäuresynthese nicht durch derartige Oxydationsvorgänge geliefert wird, sondern durch die Spaltung von ATP-ase. FLASCHENTRÄGER (1966)

nimmt an, daß die physiologische Funktion der Hippuricase primär in der Synthese und nicht in der Spaltung der Hippursäure liegt.

Das Optimum für die Hydrolyse der Hippursäure durch die Aminoacylase wird mit $\text{pH}=6,8 - 7,0$ angegeben (HOFFMANN-OSTENHOF 1954).

Bei der Hippuricase handelt es sich um ein sehr stabiles Enzym:

So charakterisiert BIRNBAUM (1955) die Acylase I folgendermaßen:

"Die gefriergetrocknete Aufbereitung der Acylase I ist äußerst stabil und kann sehr lange Zeit - (in 4-6 Wochen bei 4°C verliert sie allmählich nur 30-50% ihrer Aktivität (HOPPE, SEYLER, THIERFELDER 1966) - ohne Verlust ihrer Aktivität aufgehoben werden. In Lösungen mit dem pH -Wert=7 kann das Enzym auf 70°C für 60 Minuten ohne Änderung seiner Aktivität erhitzt werden. Unterhalb eines pH -Wertes von 5 jedoch wird das Ferment sehr schnell und irreversibel bei normalen Temperaturen zerstört."

Es erscheint möglich, daß im Urin bei längerem Stehen Hippursäure durch Hippuricase, unter Umständen nach bakterieller Infektion, der Probe gespalten wird und SCHMIDT (1956) auf diese Weise Benzoessäure in seinen Harnproben finden konnte.

C. PROBLEMSTELLUNG

Diese sich widersprechenden Angaben über das Vorkommen freier Benzoessäure im menschlichen Urin waren der Grund für die vorliegende Aufgabe:

Neben einer einfachen exakten Nachweis- und Trennungsmethode für Hippur- und Benzoesäure aus dem Harn sollte herausgefunden werden, ob wirklich entgegen den natürlichen Entgiftungstendenzen des gesunden menschlichen Organismus von gesunden Individuen freie Benzoesäure über den Harn ausgeschieden wird.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Für die Prüfung auf Hippursäure und Benzoesäure im Urin gibt es grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten:

SINHA und GABRIELI (1968) haben ein säulenchromatographisches Verfahren zur Trennung von Hippur- und Benzoesäure angegeben. Dieses Verfahren erschien uns für die vorliegende Fragestellung zu aufwendig.

Unser Bestreben ging dahin ein einfacheres Verfahren zur Prüfung auf Benzoesäure und Hippursäure im Urin zu finden.

I. DAS EXTRAKTIONSVERFAHREN

Um eine mögliche Hippuricasewirkung auszuschalten, ließen wir von den gesunden Versuchspersonen den Harn direkt in ein Gefäß, das 9-10 cm³ 20% Weinsäure enthielt, geben. Dadurch wird die Hippuricase in dem auf pH=3 angesäuerten Urin irreversibel zerstört. (BIRNBAUM 1955) Von diesem angesäuerten Harn wurden 25 ml entnommen und zweimal mit je 50 ml Äther eluiert. Mit einem Scheidetrichter wurde die Ätherfraktion von der wässrigen Harnfraktion abgetrennt. Mit zwei Teelöffeln Na₂SO₄ anhydricum wurde der Ätherextrakt getrocknet. Nach Filtrieren durch Filterpapier, das mit Äther angefeuchtet war, erhielten wir nach Abdampfen des Äthers im Abdampfschälchen über Wasserdampf den Harnextrakt.

Spätere Versuche ergaben, daß Hippursäure und Benzoesäure bei pH=3 mit Äther sehr gut extrahierbar sind.

II. VORVERSUCHE MIT DER VAKUUMSUBLIMATION

Die auf dem ebenerwähnten Weg gewonnenen Harnextrakte wollten wir nun mit Hilfe der Vakuumsublimation auf Hippur- und Benzoesäure untersuchen:

Hierzu gingen wir folgendermaßen vor:

Der Harnextrakt wurde mit einem alkoholgetränkten Wattebausch vollständig aus dem Abdampfschälchen herausgewischt und dieser anschließend mit einem Fön getrocknet. Das Wattestückchen wurde dann, eingerollt in einer Spezialfolie der Firma KALLE, in eine etwa 70 cm lange Glasröhre eingezogen. Mit einem Bunsenbrenner wurde dann diese Glasröhre an dem Ende, an dem die Watte lag, zugeschmolzen. Anschließend brachten wir sie für 45 Minuten in das von SCHMIDT angegebene Vakuumsublimationsgerät ein, wobei die Watte bei der Temperaturmarke von 220° C der entsprechend der Ausbildung eines Temperaturgradienten gewickelten Heizspirale zu liegen kam.

Hierbei fanden wir die Feststellung DEISELS (1955) anhand von 9 Harnuntersuchungen und 4 Versuchen mit reiner Hippursäure bestätigt, daß sich bei Temperaturen um 200° C neben Hippursäure teilweise Benzoesäure im Sublimationsrohr abscheidet. Die Benzoesäure schlug sich in der Glasröhre im Temperaturbereich von 60 - 80° C nieder, die Hippursäure dagegen zwischen 125 - 175° C.

Die Fraktionen der beiden Säuren ließen sich eindeutig anhand der mit dem BECKMANSchen Infrarot-

Spektrophotometer gewonnenen IR-Absorptionskurven identifizieren.

III. VORVERSUCHE MIT DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Da nicht zu entscheiden war, ob Benzoesäure schon primär im Harnextrakt zu finden war oder erst bei Sublimation entstanden war, führten wir papierchromatographische Versuche durch:

Zur Untersuchung kamen 29 Harnextrakte:

Die nach D/I gewonnenen Harnextrakte wurden in den Abdampfschälchen mit 1 ml Alkohol gelöst. Davon wurden 0,05 ml dann auf Chromatographiepapier SCHLEICHER und SCHÜLL Nr. 2043 b aufgetragen.

Zur Trennung der aufgetragenen Extrakte wurden die Chromatogramme in Tröge eingebracht, deren Boden mit dem Laufmittelgemisch Butanol - Ammoniak nach ALGERI und WALKER bedeckt war.

Die Detektion der Papierchromatogramme, auf denen zusätzlich reine Hippursäure und Benzoesäure als Testsubstanzen mitgelaufen waren, erfolgte durch Betrachtung im ultravioletten Licht von 254 nm. Das Ergebnis war aber nicht sonderlich zufriedenstellend:

Die Absorptionen der einzelnen Harnfraktionen lagen sehr dicht übereinander oder aber sie gingen teilweise fließend ineinander über.

SCHMIDT (1956) gibt für das gleiche System für die Hippursäure einen Rf-Wert von 0,19 und für die Benzoesäure einen Rf-Wert von 0,37 an.

Je nach Veränderung des Laufmittelgemisches können diese Werte aber sehr viel näher zusammenrücken.

Infolgedessen war keine sichere Trennung und Unter-

scheidung zwischen Hippur- und Benzoesäure in dem genannten papierchromatographischen System möglich.

IV. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. SUCHE NACH EINEM GEEIGNETEN LAUFMITTEL

Da die papierchromatographische Trennungsmethode kein befriedigendes Ergebnis brachte, wandten wir uns der Dünnschichtchromatographie zu:

Mit selbst hergestellten Platten aus Kieselgel HF₂₅₄ (MERCK) nach STAHL für Dünnschichtchromatographie erprobten wir die verschiedensten Laufmittel zur Trennung der Harnextrakte, die nach der unter D/I erklärten Extraktionsmethode gewonnen wurden:

Völlig ungeeignet zur Trennung von Hippur- und Benzoesäure aus Harnextrakten erwies sich Äther.

Eine Mischung von Chloroform und Äther im Verhältnis 4:1, ein polareres Laufmittel als Äther, brachte zwar für die Benzoesäure einen hohen Rf-Wert, die Hippursäure aber blieb am Startpunkt liegen.

Fast dasselbe Bild ergab das Laufmittelgemisch Chloroform-Aceton im Verhältnis 1:1.

Auf der Suche nach einem zur Trennung von Benzoesäure und Hippursäure geeigneten Laufmittel zogen wir auch das Laboratoriumshandbuch für Dünnschichtchromatographie von STAHL (1962) zu Rate:

Zwar fanden wir darin keinerlei Angaben über die Hippursäure, dafür aber über die Benzoesäure:

STAHL (1962) gibt für die Auftrennung der Arzneimitteln-

kombination Benzoessäure-Coffein das Laufmittelgemisch Chloroform-Cyclohexan-Eisessig im Verhältnis 80:20:10 an. Dieses Laufmittel erwies sich auch für die Trennung von Hippursäure und Benzoessäure aus Harnextrakten als sehr geeignet. Zwar brachten die selbsthergestellten Dünnschichtplatten noch kein voll befriedigendes Ergebnis, jedoch bei Verwendung der Fertigplatten für Dünnschichtchromatographie der Firma WOELM SiO₂ F 254/366 hatten wir ein sehr geeignetes System zur Trennung der Hippur- und Benzoessäure gefunden.

Die Detektion erfolgte wieder im ultravioletten Licht bei 254 nm.

Während die Benzoessäure einen sehr hohen Rf-Wert von 0,79 zeigt, ist der der Hippursäure mit 0,22 verhältnismäßig niedrig, so daß eine eindeutige Unterscheidung und Trennung der beiden Säuren möglich ist.

Die für Benzoessäure ermittelte Nachweisgrenze liegt mit diesem System bei 2 γ.

2. WIEDERFINDUNGSVERSUCHE

Wiederfindungsversuche anderer Untersucher (HUBER 1972), (PICHOTKA 1972), (SCHUBERT 1872), (WAURIG 1972), ergaben unter Verwendung unseres Systems bestehend aus den Fertigplatten der Firma WOELM SiO₂ F 254/366 für Dünnschichtchromatographie und dem Laufmittelgemisch Chloroform-Cyclohexan-Eisessig im Verhältnis 80:20:10, daß die Ausbeute hierbei für Hippursäure und Benzoessäure bei 80% liegt.

3. PRÜFUNG AUF FREIE BENZOESÄURE IM HARN VON 30 PERSONEN

Nachdem wir nun den Weg zur qualitativen und quantitativen Trennung der Hippursäure und der Benzoessäure gefunden hatten, interessierte uns die Frage der Ausschei-

dung dieser beiden Säuren über den menschlichen Harn bei gesunden Individuen:

Um zu prüfen, ob der Harn gesunder Personen freie Benzoesäure enthält, untersuchten wir von je 10 gesunden Personen frischen, sofort auf pH=3 angesäuerten Morgen-, Mittags- und Abendharn, also je eine Harnprobe von 30 verschiedenen Personen:

In allen 30 Proben fanden wir die in der Literatur als Harnausscheidungsprodukt vielfach genannte Hippursäure. In keiner der 30 Harnproben konnten wir jedoch freie Benzoesäure finden.

Diese Tatsache wird nun die Grundlage für weitere Untersuchungen sein.

E. DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, daß Benzoesäure im allgemeinen im menschlichen Organismus durch Bindung an Glycin zu Hippursäure entgiftet und im Urin ausgeschieden wird.

Jedoch wurde auch freie Benzoesäure von PERRY und Mitarbeitern (1971) bei chronisch Schizophrenen unter entsprechender Verminderung des Hippursäureanteils gefunden. PERRY und Mitarbeiter (1971) stellten jedoch auch fest, daß bei gesunden Kontrollpersonen keine freie Benzoesäure im Urin gefunden werden konnte.

QUASTEL und WALES (1938 und 1940) machten ebenfalls an einer Gruppe von Schizophrenen nach oralen oder intravenösen Gaben von Natriumbenzoat die Beobachtung, daß die Kranken abweichend zu Gesunden freie Benzoesäure im Urin ausschieden.

Manche Autoren nehmen an, daß nach Gabe von Medikamenten

freie Benzoesäure im Harn gesunder Personen vermehrt auftreten kann.

So glaubte SCHMIDT (1956) unter Berufung auf WALZ (1954), DEISEL (1955) und BURGDORF (1958), daß Benzoesäure nach Gaben von Medikamenten in freier Form im Harn auftritt, wo sie an sich schon ohne Medikamentengaben in stark wechselnden Mengen vorkommen soll.

Während WALZ (1954) zwei verschiedene Kristallarten, deren Mikroschmelzpunkt er u.a. ermittelte, aus Harn sublimierte, die er jedoch nicht identifizieren konnte, identifizierte DEISEL (1955) diese beiden Kristallarten als Hippur- und Benzoesäure:

DEISEL (1955) erwähnt jedoch, wobei er sich auf Literaturangaben stützt, daß die Benzoesäure mit größter Wahrscheinlichkeit durch Erhitzen der Hippursäure über 200° C als Zersetzungsprodukt entstanden ist und vermutlich nicht im Harn gesunder Menschen zu finden sei.

BURGDORF (1958), der seine frischen Harnproben ebenfalls auf dem Wege der Vakuumsublimation auftrennte, sublimierte ebenfalls Benzoesäure.

Um diese widersprechenden Angaben zu klären, wurde zunächst ein sehr empfindliches, Hippur- und Benzoesäure sehr gut trennendes, dünnschichtchromatographisches Verfahren entwickelt und untersucht, ob bei normalen Versuchspersonen im Morgen-, Mittags- und Abendharn freie Benzoesäure vorkommt.

Zu diesem Zwecke wurden Harnproben im sauren Milieu nach sofortigem Ansäuern auf pH=3, um eine mögliche

Wirkung der Hippuricase zu unterbinden, mit Äther extrahiert.

Auf diese Weise können Hippur- und Benzoesäure zu 80% wiedergefunden werden, wie Zusatzversuche ergaben. Die erhaltenen Harnextrakte, die nach der unter D/I beschriebenen Methode gewonnen wurden, trennten wir dünnenschichtchromatographisch auf Fertigplatten der Firma WOELM SiO_2 F 254/366 mit dem Laufmittelgemisch Chloroform-Cyclohexan-Eisessig, im Verhältnis 80:20:10. Mit diesem System ist eine sehr gute Trennung und Unterscheidung von Hippur- und Benzoesäure möglich, da man für die beiden Säuren sehr unterschiedliche Rf-Werte erhält:

Während der der Benzoesäure bei 0,79 liegt, ist der Rf-Wert der Hippursäure 0,22.

Die Nachweisgrenze für Benzoesäure liegt mit diesem System bei 2γ .

In keinem der untersuchten Harnextrakte konnte freie Benzoesäure nachgewiesen werden.

Das stimmt überein mit den Angaben von PERRY und Mitarbeitern (1971), die bei gesunden Personen nie freie Benzoesäure finden konnten.

Weitere Untersuchungen müssen nun ergeben, ob Medikamente einen Einfluß auf die Ausscheidung von freier Benzoesäure im Harn oder auf die ausgeschiedene Hippursäuremenge haben.

LITERATURANGABEN

1. AMMON R., DIRSCHERL W., MYRBÄCK K.
Fermente, Hormone, Vitamine
Band I: Fermente
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1959)
2. BARMAN T. E.
Enzyme Handbook
Vol. II
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
3. BERCZELLER L.
Über die Ausscheidung von körperfremden Sub-
stanzen im Harn
Bio. Z. 84, 75 (1917)
4. BIRNBAUM S. M.
Aminoacylase
Amino Acids Acylases I and II from Hog Kidney
Methods in Enzymology 2, 115 (1955)
5. BUDDECKE E.
Grundriß der Biochemie
Walter De Gruyter & Co., Berlin (1970)
6. BURGENDORF W.
Untersuchungen über die Größe der Diäthoxalsäure-
ausscheidung im Harn und über die Veränderungen der
Diäthoxalsäure und des Adalins bei experimenteller
Harnfäulnis.
Inaugural-Dissertation der Universität Erlangen (1958)

7. DEISEL K.
Untersuchungen zur Frage der Ausscheidung von
Bromdiaethylcarbamid im Harn
Inaugural-Dissertation der Universität Erlangen (1954)
8. Enzyme Nomenclature
Recommendations 1964 of the International Union
of Biochemistry
Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York (1965)
9. FLASCHENTRÄGER B., LEHNARTZ E.
Physiologische Chemie
Band II/ 2 dα
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
10. Documenta GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen
7. Auflage
J. R. GEIGY A. G., Pharma, Basel (1968)
11. HOEBER R.
Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe
Stämpfli und Cie, Bern (1947)
12. HOFFMANN-OSTENHOF O.
Enzymologie
Springer-Verlag, Wien (1954)
13. HOPPE, SEYLER, THIERFELDER
Handbuch der Physiologisch- und Pathologischen
Analyse
Band VI/C
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)

14. HUBER R.
Dissertation Erlangen 1972 in Vorbereitung
15. LIMPRICHT, VON USLAR
Über die Bildung des Stickstoffbenzoyls aus Hippursäure
Ann. d. Chemie 88, 133 (1853)
16. PARK R. W., FOX S. W.
An Acylase System Related to the Utilization of
Benzoylamino Acids by Lactobacillus arabinosus
J. Biol. Chem. 235, 3193 (1960)
17. PERRY T. L., HANSEN S., DIAMOND S., MELANCON S.B., LESK D.
Acetic and Benzoic Acids in Urine of Patients with
Chronic Schizophrenia
Clin. Chim. Acta 31, 181 (1971)
18. PICHOTKA R.
Dissertation Erlangen 1972 in Vorbereitung
19. QUASTEL I. H., WALES W. T.
Faulty Detoxikation in Schizophrenia
Abnormal Excretion of Hippuric Acid after Administra-
tion of Benzoate
Lancet (1938), 301
20. QUASTEL I. H., WALES W. T.
Faulty Detoxikation in Schizophrenia
Abnormal Excretion of Hippuric Acid after Administra-
tion of Sodium Benzoate
Lancet (1940), 402

21. RAO K. R., BIRNBAUM S. M., GREENSTEIN J. P.
Enzymatic Susceptibility of Comparable N-acylated
L-, D-, and Dehydroamino Acids
J. Biol. Chem. 203, 1 (1953)

22. RAPOPORT S. M.
Medizinische Biochemie
5. Auflage
VEB-Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1969)

23. SCHENK M., KOLB E.
Grundriß der Physiologischen Chemie für Veterinär-
mediziner, Humanmediziner und Biologen
5. Auflage
VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1964)

24. SCHMIDT G.
Vorkommen und Ausscheidung von α -Äthyl- α -Oxybutter-
säure nach Adalinalaufnahme
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 229, 67 (1956)

25. SCHUBERT B.
Dissertation Erlangen 1972 in Vorbereitung

26. SCHÜLLER J.
Über die Entgiftungspaarungen im Organismus
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 106, 265 (1925)

27. SINHA S. N., GABRIELI E. R.
A Simple Method for Simultaneous Determination of
Benzoic and Hippuric Acids in Biological Fluids
Clin. Chim. Acta 19, 313 (1968)

28. STAHL E.
Dünnschichtchromatographie
2. Auflage
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
29. STRAUB B. F.
Biochemie
2. Auflage
Akadémiai Kiadó
Verlag der ungarischen Akademie d. Wissenschaften
Budapest (1963)
30. WALZ K. E.
Beitrag zur Frage der Ausscheidung und des Nachweises
von Adalin im Harn
Inaugural-Dissertation der Universität Erlangen (1954)
31. WAURIG R.
Dissertation Erlangen 1972 in Vorbereitung

Danksagung

Meinen besten Dank darf ich Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. E. Weinig, Vorstand des Institutes für Gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut und für die Übernahme des Correferates aussprechen.

Ein besonderes Bedürfnis ist es mir, Frau Professor Dr. med. Dr. phil. nat. M. Geldmacher-von Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und die jederzeit hilfreiche Beratung in Fragen zu dieser Arbeit Dank zu sagen.

Lebenslauf

Am 19. September 1942 wurde ich, Harald Georg Franz ZIENER als Sohn des Revisors Robert Ziener und seiner Ehefrau Anni, geborene Rosinski, in Nürnberg geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Neuen-dettelsau, wohin wir 1943 evakuiert wurden. Das Humanistische Gymnasium in Windsbach besuchte ich von 1952 bis 1962 und schloß es mit dem Abitur ab.

Von 1962 bis 1964 leistete ich meinen Militärdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich das Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Im Sommersemester 1966 wechselte ich auf das Fach Zahnmedizin über, das ich am 5. Juli 1971 mit dem zahnmedizinischen Staatsexamen abschloß.

Seit dem 1. September 1971 bin ich als Ausbildungsassistent in einer Zahnarztpraxis in Ansbach tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990